

# 贝莱斯芽孢杆菌产抑菌物质培养基发酵优化

刘军<sup>1</sup>, 江宇琪<sup>1</sup>, 刘康<sup>1</sup>, 代航培<sup>1</sup>, 黄翠欣<sup>1</sup>, 王凤青<sup>1</sup>, 李丽<sup>1</sup>, 李仲玄<sup>1,2\*</sup>, 陈鲜鑫<sup>3</sup>, 陈玲<sup>4</sup>  
(1. 四川轻化工大学生物工程学院, 四川宜宾 644000) (2. 固态发酵资源利用四川省重点实验室, 四川宜宾 644000) (3. 乐山市农业科学研究院, 四川乐山 614001) (4. 巨星农牧有限公司, 四川成都 611230)

**摘要:** 为提高贝莱斯芽孢杆菌产抑菌活性物质的能力, 研究采用单因素实验、Plackett-Burman 试验、最陡爬坡试验和 Box-Behnken 进行发酵工艺优化。试验结果表明, 乳糖和硝酸钠分别为发酵培养基的最适碳源和氮源, Plackett-Burman 试验确定影响贝莱斯芽孢杆菌抑菌能力的显著因素为接种量、硝酸钠和发酵时间, 最陡爬坡试验和响应面试验确定最佳工艺条件为乳糖添加量 10 g/L, 硝酸钠添加量 6.15 g/L, 接种量 3%, 转速 220 r/min, 温度 34 °C, 发酵时间 30.7 h, 在此条件下抑菌圈直径为 17.6 mm, 较优化前提高了 55%, 活菌数从优化前的  $2.42 \times 10^8$  CFU/mL 提升到  $6.71 \times 10^8$  CFU/mL。该研究有利于贝莱斯芽孢杆菌作为潜在益生菌的进一步开发利用, 提高该菌株抗食品腐败微生物的能力。

**关键词:** 贝莱斯芽孢杆菌; 抑菌物质; 发酵; 响应面

文章编号: 1673-9078(2024)06-114-123

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.6.0756

## Optimization of Fermentation Medium for the Production of Antibacterial Substances by *Bacillus velezensis*

LIU Jun<sup>1</sup>, JIANG Yuqi<sup>1</sup>, LIU Kang<sup>1</sup>, DAI Hangpei<sup>1</sup>, HUANG Cuixin<sup>1</sup>, WANG Fengqing<sup>1</sup>, LI Li<sup>1</sup>,  
LI Zhongxuan<sup>1,2\*</sup>, CHEN Xianxin<sup>3</sup>, CHEN Ling<sup>4</sup>

(1.School of Biological Engineering and Wuliangye Liquor, Sichuan University of Science & Engineering, Yibin 644000, China)(2.Solid-state Fermentation Resource Utilization Key Laboratory of Sichuan Province, Yibin 644000, China)(3.Leshan Academy of Agricultural Sciences, Leshan 614001, China)  
(4.Giantstar Farming and Husbandry Corporation Limited, Chengdu 611230, China)

**Abstract:** To improve the ability of *Bacillus velezensis* to produce inhibitory substances, the fermentation process was optimized using single-factor experiments, Plackett-Burman test, steepest ascent test, and the Box-Behnken design. The results showed that lactose and sodium nitrate were the optimum carbon and nitrogen sources for the fermentation medium. The Plackett-Burman test showed that the significant factors affecting were the inoculum, sodium nitrate concentration, and fermentation time. The steepest ascent test and response surface test determined the optimum conditions as 10 g/L lactose, 6.15 g/L sodium nitrate, 3% inoculum, a rotational speed of 220 r/min, 34 °C, and 30.7 h of

引文格式:

刘军,江宇琪,刘康,等.贝莱斯芽孢杆菌产抑菌物质培养基发酵优化[J].现代食品科技,2024,40(6):114-123.

LIU Jun, JIANG Yuqi, LIU Kang, et al. Optimization of fermentation medium for the production of antibacterial substances by *Bacillus velezensis* [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(6): 114-123.

收稿日期: 2023-06-20

基金项目: 四川省科技厅重点研发计划项目(2023YFN0020); 固态发酵资源利用四川省重点实验室开放基金项目(2021GTJC05; 2022GTYY03); 四川轻化工大学大学生创新创业项目(cx2022134)

作者简介: 刘军(1964-), 男, 教授, 研究方向: 食品加工, E-mail: scbnc@163.com

通讯作者: 李仲玄(1992-), 女, 博士, 研究方向: 发酵工程, E-mail: lzx1445@163.com

fermentation. Under these conditions, the diameter of the inhibition circle was 17.6 mm, which was 55% higher than the diameter before optimization. The biomass increased from  $2.42 \times 10^8$  CFU/mL before optimization to  $6.71 \times 10^8$  CFU/mL. The findings of this study are beneficial to the further development and utilization of *B. velezensis* as a potential probiotic and to improve the ability of the strain to resist food spoilage microorganisms.

**Key words:** *Bacillus velezensis*; bacteriostatic substances; ferment; response surface

微生物造成的食品污染已对消费者的健康构成威胁<sup>[1]</sup>, 食源性致病菌会引起人们食物中毒、肠道感染等多种疾病<sup>[2]</sup>。防止此类食品污染可以显著降低食品安全风险。生物活性物质用于抑制食物的微生物变质已被证明是绿色和安全的<sup>[3]</sup>。传统的化学法处理效率低, 并会对环境造成危害, 而微生物控制是解决上述危害的替代方法<sup>[4]</sup>。

芽孢杆菌通过非核糖体肽合成酶产生主要的环状脂肽, 如 iturin、fengycin 和 surfactin, 能够生成肽、脂肽抗生素以及细菌素等多种对病原菌生长的抗菌物质<sup>[5]</sup>, 其中, iturin 和 fengycin 具有较强的抗真菌活性。Deravel 等<sup>[6]</sup>研究表明 iturin 对莴苣霜霉病具有较高的抗真菌活性, Guo 等<sup>[7]</sup>发现 fengycin 对尖孢镰刀菌也有一定的抗真菌活性; surfactin 具有广谱抗菌作用, 邓丽等<sup>[8]</sup>实验表明, 贝莱斯芽孢杆菌对金黄色葡萄球菌有良好的抑制作用, 朱亚珠 等<sup>[9]</sup>研究发现, 贝莱斯芽孢杆菌对大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、李斯特菌等多种食源性致病菌具有拮抗效果。值得注意的是, iturin、surfactin 和 fengycin 也可以协同作用, 有效增强它们的生物活性<sup>[10]</sup>。不同芽孢杆菌产抑菌物质的能力不同, 培养条件如碳源、氮源、温度、时间等都对菌株分泌抑菌物质有影响。Singh 等<sup>[11]</sup>实验表明, 蔗糖作为碳源能够提高其表面活性素, 而甘油却相反; Mizumoto 等<sup>[12]</sup>研究发现碳源、氮源的浓度能显著影响菌株 iturin 的产量, 但接种量、温度等培养条件却影响不显著; 刘瑾等<sup>[13]</sup>通过单因素试验及响应面法对贝莱斯芽孢杆菌 P9 进行优化, 优化后的抑菌圈直径较之前扩大了 1.7 倍; 韩旭东等<sup>[14]</sup>对芽孢杆菌 ZYCHH-01 的培养条件进行响应面优化, 优化后抑菌圈直径达到 21.12 mm。

贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) 是由 Ruiz-García 等分离出的一株新型生防菌, 作为芽孢杆菌属的新种<sup>[15,16]</sup>, 其同样具有多种参与脂肽、细菌素等合成的基因簇, 这些物质具有高效的抗菌活性<sup>[17]</sup>。贝莱斯芽孢杆菌具有优良的生长特性、较强的抑菌活性和广泛的抗菌谱<sup>[18]</sup>, 加之其孢子具有显著的抗性和休眠能力<sup>[19]</sup>, 使得贝莱斯芽孢杆菌在食

品工业中具有好的发展前景<sup>[20]</sup>。本课题组分离得到一株贝莱斯芽孢杆菌, 前期研究表明其对各种食源性病原菌如大肠杆菌、李斯特菌和金黄色葡萄球菌具有较好的抑制作用。因此本文以抑菌圈直径为指标, 采用单因素试验、Plackett-Burman 试验、最陡爬坡试验和中心组合优化设计对贝莱斯芽孢杆菌的发酵培养基的组分、发酵工艺条件进行优化。旨在提高该菌抑菌物质的产量, 为其在食品工业中的潜在应用提供一定的理论和实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

#### 1.1.1 材料

贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*), 由本课题组分离保存; 大肠杆菌 K88 (*E. coli* K88)、李斯特菌 (*Listeria monocytogenes* ATCC 1911), 由实验室保存。

#### 1.1.2 培养基

NB 培养基: 蛋白胨 10 g、牛肉粉 3 g、氯化钠 5 g、蒸馏水 1 L, pH 值 7.0, 固体培养基加入 15 g 琼脂粉。

Landy 培养基: 20 g 葡萄糖、谷氨酸钠 5 g、蛋白胨 10 g、七水合硫酸镁 0.5 g、氯化钾 0.5 g、磷酸二氢钾 1 g、硫酸亚铁 0.15 mg、硫酸锰 5 mg、硫酸铜 0.16 mg, 蒸馏水 1 L, pH 值 7.0~7.2, 121 °C 灭菌 30 min。

#### 1.1.3 试剂

蛋白胨、牛肉粉、牛肉膏、玉米粉、可溶性淀粉、酵母浸粉, 北京奥博星生物技术有限责任公司; 氯化钠、乳糖、谷氨酸钠、硫酸镁、氯化钾、磷酸二氢钾、硫酸亚铁、硫酸锰、硫酸铜、尿素, 成都市科龙化学品有限公司; 葡萄糖、蔗糖、硝酸铵、硝酸钠、氯化铵、木糖、麦芽糖、糊精, 天津市科密欧化学试剂有限公司。

### 1.2 仪器与设备

智能恒温恒湿培养箱, 杭州绿博仪器有限公司;

TGL-23 高速冷冻离心机, 四川蜀科仪器有限公司; YXQ-75SII 立式压力灭菌锅, 上海博讯医疗生物仪器股份有限公司; QYC-2102C 振荡培养箱, 上海福马实验设备有限公司; PHS-3C pH 计, 上海佑科仪器仪表有限公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 菌种活化及种子液的制备

取 -20 °C 保藏的贝莱斯芽孢杆菌和大肠杆菌 K88, 接种于 NB 培养基, 于 37 °C 培养箱中培养 24 h。将活化好的菌体接种于 NB 液体培养基中, 180 r/min、37 °C 震荡培养 12~18 h。

#### 1.3.2 上清液抑菌活性的测定

采用牛津杯法: 取贝莱斯芽孢杆菌发酵液于 10 000 r/min, 离心 10 min, 再用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 除去菌体。取 200 μL 经梯度稀释后的指示菌 (菌浓度  $10^6 \sim 10^7$  CFU/mL) 涂布于 NB 固体培养基, 将灭菌的牛津杯均匀放置于培养基上, 牛津杯孔内加样量为 200 μL, 等量无菌发酵液作为空白对照。37 °C 恒温培养 8~12 h, 观察并测量抑菌圈直径。

#### 1.3.3 单因素试验设计

以 Landy 培养基为基础, 分别选用不同碳源 (玉米粉、葡萄糖、蔗糖、可溶性淀粉、木糖、麦芽糖、乳糖、糊精, 添加质量浓度均为 20 g/L) 替换基础培养基的葡萄糖, 最佳添加量 (5、10、15、20、25、30 g/L)、不同氮源 (谷氨酸钠、尿素、蛋白胨、硝酸铵、硝酸钠、氯化铵、酵母浸粉、牛肉膏)、最佳添加量 (1、3、5、7、9 g/L)、发酵温度 (28、31、34、37、40 °C)、发酵时间 (18、24、30、36、42、48、54 h)、接种量 (1%、2%、4%、6%、8%)、转速 (140、160、180、200、220、240 r/min), 其他培养基成分不变。30 °C、180 r/min 培养 24 h, 以牛津杯法测定上清液的抑菌效力, 每组设三个平行, 确定最佳单因素条件。

#### 1.3.4 Plackett-Burman 试验设计筛选发酵显著影响因子

采用 Design Expert 8.0 软件。从单因素试验得到的结果中, 对碳源、氮接种量、温度、发酵时间和转速 6 个因素进行 P-B 试验, 以抑菌圈直径为响应值, 将每个因素分为高 (+1)、低 (-1) 两水平, 筛选出对贝莱斯芽孢杆菌产抑菌物质具有显著影响的因素。Plackett-Burman 试验设计见表 1。

表 1 Plackett-Burman 试验设计

Table 1 Plackett-Burman experiment design

因素	编码	水平	
		-1	1
乳糖/(g/L)	X <sub>1</sub>	7	15
硝酸钠/(g/L)	X <sub>2</sub>	5	8
接种量/%	X <sub>3</sub>	2	6
温度/°C	X <sub>4</sub>	34	37
时间/h	X <sub>5</sub>	36	44
转速/(r/min)	X <sub>6</sub>	200	220

#### 1.3.5 最陡爬坡试验

在 Plackett-Burman 试验得到的 3 个显著性因素的基础上, 根据回归系数和 3 个因素的效应值大小确定最陡爬坡试验的爬坡方向和步长, 确定包含最优值的因素范围, 寻找后续响应面设计需要的中心点, 试验设计如表 2 所示。

表 2 最陡爬坡试验设计

Table 2 Design of steepest climbing test

试验号	X <sub>2</sub> 硝酸钠/(g/L)	X <sub>3</sub> 接种量/%	X <sub>5</sub> 时间/h
1	8	6	36
2	7.4	5	34
3	6.8	4	32
4	6.2	3	30
5	5.6	2	28
6	5	1	26

#### 1.3.6 Box-Behnken 中心组合优化设计

在爬坡试验结果的基础上, 利用 Design-Expert 8.0 软件, 各取 3 个水平 (-1、0、1), 进行响应面分析试验, 并运用数据统计分析软件进行数据分析, 得到最佳工艺配方的条件。以接种量、硝酸钠和时间 3 个显著因素为自变量, 抑菌圈直径为响应值 (Y), 试验设计见表 3。

表 3 Box-Behnken 中心组合优化设计

Table 3 Box-Behnken center portfolio optimization design

因素	编码	编码水平		
		-1	0	1
接种量/%	A	2	3	4
硝酸钠/(g/L)	B	5.6	6.2	6.8
时间/h	C	28	30	32

#### 1.3.7 响应面优化结果验证

将贝莱斯芽孢杆菌活化后, 以优化前 Landy 培养基发酵液为对照, 分别选取革兰氏阴性及阳性细

菌(大肠杆菌、李斯特菌)为指示菌,验证响应面优化效果。

### 1.3.8 数据统计与分析

试验数据分别采用 Design-Expert 8.0、SPSS Statistics 26 和 Prism 9, 结果表示为 3 次重复试验“平均值 ± 标准差”。

## 2 结果与讨论

### 2.1 单因素试验

#### 2.1.1 最适碳源

8 种碳源对贝莱斯芽孢杆菌抑菌效果的影响见图 1。葡萄糖、糊精、蔗糖、乳糖等 8 种碳源均能使贝莱斯芽孢杆菌产生抑菌物质。碳源为乳糖时产生的抑菌圈直径达到最大,为 12 mm,其次为葡萄糖、蔗糖、糊精、果糖、淀粉、玉米粉、麦芽糖。乳糖作为迟效碳源<sup>[21]</sup>,更有利于贝莱斯芽孢杆菌次级代谢产物的合成,与其他碳源相比,碳源为乳糖时抑菌圈直径达到了显著差异水平( $P < 0.05$ ),因此,贝莱斯芽孢杆菌发酵的最适碳源为乳糖<sup>[22]</sup>。如图 2 所示,当乳糖浓度为 10 g/L(质量浓度)时,抑菌活性达到最大,为 13.2 mm,随着乳糖浓度的增加,抑菌圈直径逐渐变小,因此选择 10 g/L(质量浓度)为乳糖最适添加量。

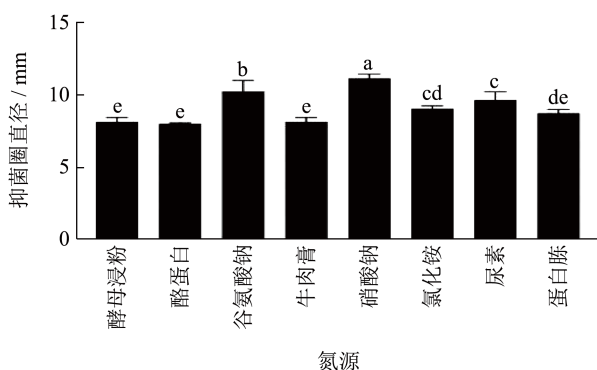


图 1 不同碳源对抑菌活性的影响  
Fig.1 Effect of different carbon sources on the antibacterial activity

注:小写字母不同表示差异性显著,  $P < 0.05$ , 下同。

#### 2.1.2 最适碳源添加量

最佳碳源添加量如图 2 所示,当乳糖浓度为 10 g/L(质量浓度)时,抑菌活性达到最大,为 13.2 mm,随着乳糖浓度的增加,抑菌圈直径逐渐变小,因此选择 10 g/L(质量浓度)为乳糖最适添加量。

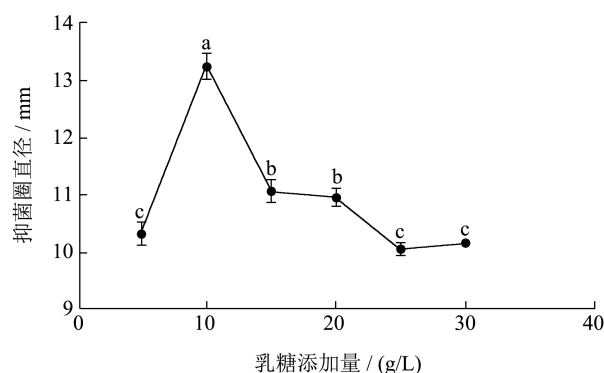


图 2 乳糖添加量对抑菌活性的影响

Fig.2 Effect of lactose content on the antibacterial activity

#### 2.1.3 最适氮源

氮源是细菌生长和代谢产物生产的关键养分<sup>[23]</sup>。氮源对贝莱斯芽孢杆菌抑菌能力的影响结果见图 3。在选择的酵母浸粉、酪蛋白、谷氨酸钠等 8 种氮源中,以硝酸钠为氮源时抑菌圈直径达到最大,为 11.7 mm,其次为谷氨酸钠、尿素、蛋白胨、酪蛋白、酵母浸粉、牛肉膏、氯化铵。相较于有机氮源,无机氮源更有利于贝莱斯芽孢杆菌分泌抑菌物质,硝酸钠作为氮源时,与其他氮源相比,其抑菌圈直径达到了显著差异水平( $P < 0.05$ ),因此认为硝酸钠为贝莱斯芽孢杆菌发酵的最适氮源。Abdel-Mawgoud 等<sup>[24]</sup>实验结果表明,有机氮源有助于细胞生长,但在产生表面活性素等代谢产物时却不如无机氮源硝酸钠。如图 4 所示,当硝酸钠为 7 g/L(质量浓度)时,抑菌活性达到最大,为 12.3 mm,随着硝酸钠浓度增加,抑菌圈直径逐渐变小,因此选择 7 g/L(质量浓度)为硝酸钠最适添加量。

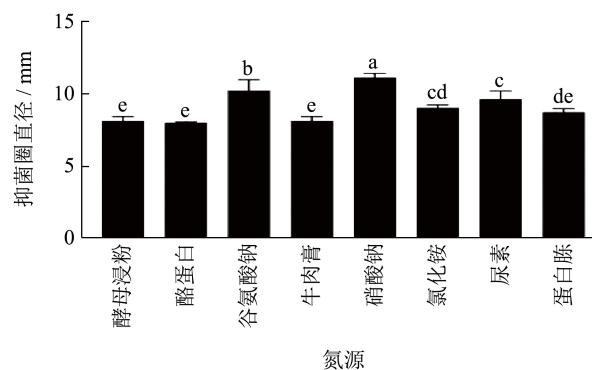


图 3 不同氮源对抑菌活性的影响

Fig.3 Effect of different nitrogen sources on the antibacterial activity

#### 2.1.4 最适氮源添加量

最适氮源添加量如图 4 所示,当硝酸钠为 7 g/L

(质量浓度)时, 抑菌活性达到最大, 为 12.3 mm, 随着硝酸钠浓度增加, 抑菌圈直径逐渐变小, 因此选择 7 g/L (质量浓度) 为硝酸钠最适添加量。

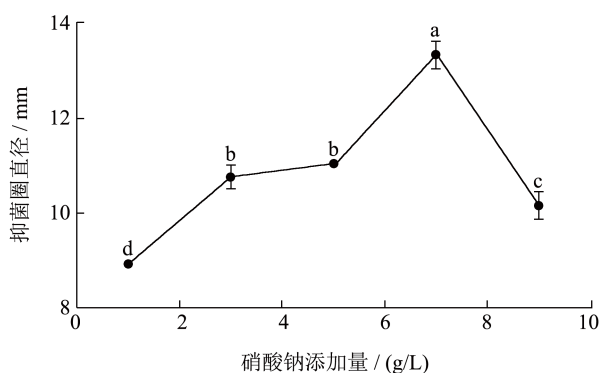


图 4 硝酸钠添加量对抑菌活性的影响

Fig.4 Effect of  $\text{NaNO}_3$  content on the antibacterial activity

### 2.1.5 发酵温度对抑菌活性的影响

温度是影响细菌生长和代谢的重要因素, 主要通过影响酶的反应速率及蛋白质性质, 从而影响细菌的代谢产物生成<sup>[25]</sup>。温度过高时, 菌体的代谢会加快, 菌体衰老的速度也会加快。温度太低则会导致菌体生长速率缓慢, 抗菌物质的产量减少。发酵温度对贝莱斯芽孢杆菌抑菌活性影响见图 5。在 28~40 °C 的温度范围中, 抑菌圈直径呈先增后降的趋势, 在 34 °C 时抑菌活性达到最大, 为 12.6 mm, 并有显著差异 ( $P < 0.05$ ), 随着温度的增加, 细菌的代谢产物逐渐减少。Ohno 等<sup>[26]</sup>表明在 23~48 °C 范围中, 抗菌代谢产物在 37 °C 前随着温度的升高而增加, 但超过 37 °C 代谢产物得率则降低。Chen 等<sup>[10]</sup>表明多数抗菌代谢产物适宜温度为 25~37 °C。综上所述, 选择 34 °C 作为最是发酵温度进行后续实验。

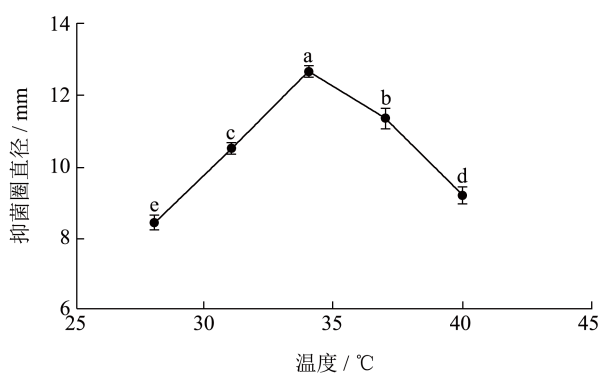


图 5 温度对抑菌活性的影响

Fig.5 Effect of different fermentation temperature on the antibacterial activity

注: 1~5 组分别表示温度为 28、31、34、37、40 °C。

### 2.1.6 接种量对抑菌活性的影响

接种量对菌株生长繁殖和产生有效代谢物均有影响, 适宜的接种量可以加快产物的合成速度<sup>[23]</sup>。接种量对贝莱斯芽孢杆菌抑菌能力的影响见图 6。在 1%~8% (体积分数) 的接种量范围中, 抑菌活性随着接种量的增加而上升, 在 4% (体积分数) 时抑菌活性最强, 为 13.6 mm, 出现了显著差异水平 ( $P < 0.05$ ), 但在超过 4% (体积分数) 时, 贝莱斯芽孢杆菌的抑菌能力逐渐下降, 这与丰磊等<sup>[27]</sup>的研究结果一致, 这可能是由于接种量过大引起菌体生长过快, 不利于抗菌产物的积累。因此选择最适接种量为 4% (体积分数)。

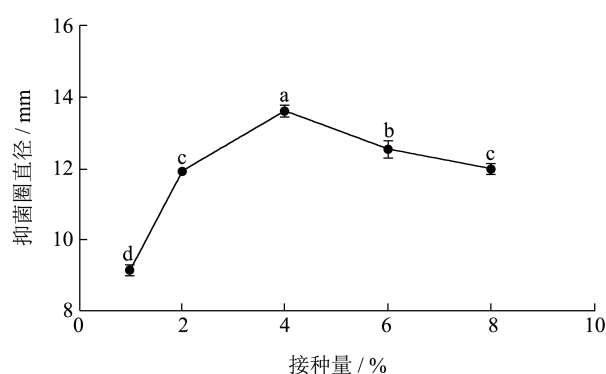


图 6 接种量对抑菌活性的影响

Fig.6 Effect of different inoculum size on the antibacterial activity

注: 1~5 组分别表示接种量为 1%、2%、4%、6%、8%。

### 2.1.7 发酵时间对抑菌活性的影响

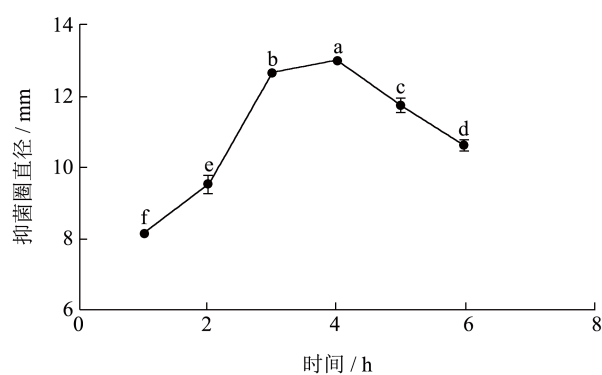


图 7 发酵时间对抑菌活性的影响

Fig.7 Effect of different fermentation time on the antibacterial activity

注: 1~6 组分别表示发酵时间为 24、30、36、42、48、54 h。

发酵时间对抑菌活性影响见图 7。在选定的 24~48 h 之间, 贝莱斯芽孢杆菌抑菌活性呈先上升后下降的趋势, 这可能是由于在细菌培养过程中营养物质的不断消耗和代谢产物的不断积累<sup>[28]</sup>。发酵

至 24 h 时, 贝莱斯芽孢杆菌已经开始分泌抑菌物质, 随着发酵时间的延长, 抑菌圈直径逐渐增加, 拮抗物质正在逐渐积累, 到 42 h 时抑菌活性最大, 达到 12.9 mm。而在 42 h 之后, 抑菌活力不再增高, 与兰成忠等<sup>[29]</sup>的趋势一致。由此认为 42 h 为最适发酵时间。

### 2.1.8 转速对抑菌活性的影响

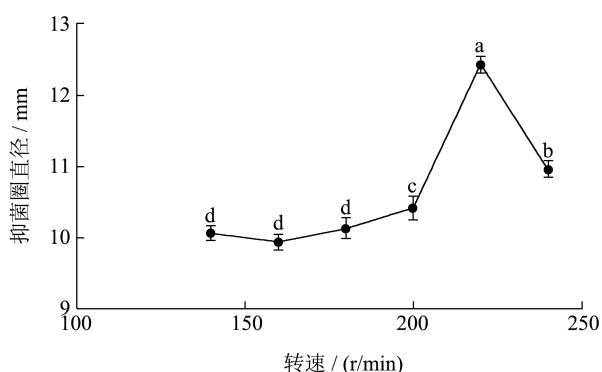


图 8 转速对抑菌活性的影响

Fig.8 Effect of different rotate speed on the antibacterial activity

注: 1~6 组分别表示转速为 140、160、180、200、220、240 r/min。

溶氧量对细菌次级代谢产物的产生具有重要影响, 转速太低, 通气量小, 不利于细菌的生长。如果速率过高, 菌株可能会过早进入衰变阶段, 不利于菌株的新陈代谢<sup>[30]</sup>, 过低或过高转速都不利于发酵。贝莱斯芽孢杆菌属于好氧菌, 适当提高转速,

使得溶氧量增加, 有利于提高菌体抗菌代谢产物的产生。由图 8 可知, 转速在 140~220 r/min 时, 随着溶氧量的增加, 抑菌活性逐渐增大, 在转速为 220 r/min 时抑菌效果最好, 满足发酵所需溶氧量, 抑菌圈直径为 12.3 mm, 达到了显著差异水平 ( $P<0.05$ ), 在超过 220 r/min 时, 抑菌圈直径减小, 呈上增下减的趋势<sup>[31]</sup>, 因此选择 220 r/min 为最适转速。

### 2.2 Plackett-Burman 试验设计筛选发酵显著影响因子

采用 Design Expert 8.0 软件, 从单因素结果中筛选出 3 个对贝莱斯芽孢杆菌抑菌效力具有显著性影响的因子。P-B 试验设计见表 4, 抑菌圈直径为试验的响应值。如表 3 所示以抑菌圈直径为响应值, 得到回归方程为  $Y=9.41-0.042A-0.62B-0.78C-0.40D-0.52E-0.78F$ 。模型相关系数为  $R^2=0.9153$ ,  $P=0.0145<0.05$ , 该模型可用。P-B 试验的方差分析如表 5 所示, 从各因素  $P$  值可知, 接种量、硝酸钠和时间对抑菌效果影响显著 ( $P<0.05$ )。根据  $F$  值将显著因素由大到小排列为接种量>硝酸钠>时间>转速>温度>乳糖, 根据回归方程各变量系数可知, 接种量、硝酸钠、转速对抑菌圈直径均表现为负效应, 选择  $F$  值前三的影响因素进行后续爬坡实验。

表 4 Plackett-Burman 试验设计及其响应值

Table 4 Plackett-Burman experiment design and response values

试验号	X <sub>1</sub> 乳糖/(g/L)	X <sub>2</sub> 硝酸钠/(g/L)	X <sub>3</sub> 接种量/%	X <sub>4</sub> 温度/°C	X <sub>5</sub> 时间/h	X <sub>6</sub> 转速/(r/min)	抑菌圈直径/mm
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	12.81 ± 0.04 <sup>a</sup>
2	1	-1	1	1	1	-1	9 ± 0.04 <sup>s</sup>
3	1	-1	-1	-1	1	-1	11.62 ± 0.08 <sup>b</sup>
4	1	1	-1	1	1	1	9.61 ± 0.09 <sup>de</sup>
5	-1	1	1	1	-1	-1	9.42 ± 0.14 <sup>ef</sup>
6	-1	1	-1	1	1	-1	9.31 ± 0.16 <sup>f</sup>
7	-1	-1	-1	1	-1	1	11.42 ± 0.04 <sup>b</sup>
8	1	-1	1	1	-1	1	9.62 ± 0.05 <sup>de</sup>
9	1	1	-1	-1	-1	1	9.73 ± 0.04 <sup>d</sup>
10	-1	-1	1	-1	1	1	9.14 ± 0.14 <sup>s</sup>
11	1	1	1	-1	-1	-1	10 ± 0.04 <sup>c</sup>
12	-1	1	1	-1	1	1	8 ± 0.08 <sup>h</sup>

注: 小写字母不同表示差异性显著,  $P<0.05$ 。

表 5 Plackett-Burman试验设计方差分析表

Table 5 Variance analysis (ANOVA) of Plackett-Burman experiment design

因素	F 检验	P 值	显著性
X <sub>1</sub> (乳糖)	0.063	0.811 3	*
X <sub>2</sub> (硝酸钠)	14.25	0.012 9	*****
X <sub>3</sub> (接种量)	21.92	0.005 4	*****
X <sub>4</sub> (温度)	2.13	0.204 1	**
X <sub>5</sub> (时间)	10.06	0.024 8	****
X <sub>6</sub> (转速)	5.60	0.064 3	**

注: \* 数量表示因素极显著性, 数量越多显著性越强。

### 2.3 最陡爬坡试验

根据已确定的因素正负效应, 并依据前期试验确定爬坡方向及步长。由表 6 可知, 抑菌圈直径呈先上升后下降的趋势, 在第 4 组试验抑菌圈活性最强, 因此后续响应面优化设计以第四组为中心点。

表 6 最陡爬坡试验设计及结果

Table 6 Steepest ascent experiment design and corresponding results

试验号	X <sub>2</sub> 硝酸钠 / (g/L)	X <sub>3</sub> 接种量 / %	X <sub>5</sub> 时间 / h	抑菌圈直径 / mm
1	8	6	36	8.92 ± 0.41 <sup>d</sup>
2	7.4	5	34	9.74 ± 0.2 <sup>c</sup>
3	6.8	4	32	12.32 ± 0.3 <sup>b</sup>
4	6.2	3	30	15.91 ± 0.2 <sup>a</sup>
5	5.6	2	28	12.22 ± 0.2 <sup>b</sup>
6	5	1	26	9.84 ± 0.2 <sup>c</sup>

注: 小写字母不同表示差异性显著,  $P < 0.05$ 。下表同。

### 2.4 Box-Behnken 中心组合优化设计

#### 2.4.1 抑菌圈直径模型建立与分析

根据 P-B 试验以及最陡爬坡试验结果, 以抑菌圈直径为响应值, 以接种量 (3%)、硝酸钠 (6.2 g/L) 和时间 (30 h) 为中心点, 对表 7 实验数据运用 Design Expert 8.0 软件对其进行多元回归拟合, 设接种量、硝酸钠、时间分别为 A、B、C, 以抑菌圈直径为响应值进行多元回归拟合, 得到二次多项回归方程:

$Y$  (抑菌圈直径) = 17.2 + 0.7A - 0.47B + 1.42C + 1.03AB - 1.93AC + 0.3BC - 2.11A<sup>2</sup> - 2.19B<sup>2</sup> - 2.09C<sup>2</sup> 回归模型系数及显著性检验结果见表 8。由表 8 可知,

该回归模型极显著 ( $P < 0.000 1$ ), 失拟项不显著 ( $P = 0.325 2 > 0.05$ ), 说明模型拟合程度良好。模型回归系数  $R^2 = 0.984 9$ ,  $R_{adj}^2 = 0.965 4$ , 表明 96.54% 的数据可用该模型解释, 表明方程具有可靠性。通过分析相关数据可以看出, 一次项硝酸钠对抑菌圈直径具有极显著影响 ( $P < 0.01$ ), 时间、接种量对抑菌圈直径具有显著影响 ( $P < 0.05$ ), 分析各因素的主效应关系为: C > A > B, 即时间 > 接种量 > 硝酸钠。其二次项交互作用 AB、AC 对抑菌圈直径具有极显著的影响 ( $P < 0.01$ ), BC 对抑菌圈直径的影响不显著 ( $P > 0.05$ )。

表 7 Box-Behnken 试验设计及其响应值

Table 7 Box-Behnken experiment design and response values

编号	A 接种量 / %	B 硝酸钠 / (g/L)	C 时间 / h	抑菌圈直径 / mm
1	2	5.6	30	13.28 ± 0.15 <sup>i</sup>
2	4	5.6	30	12.85 ± 0.07 <sup>k</sup>
3	2	6.8	30	10.88 ± 0.06 <sup>m</sup>
4	4	6.8	30	14.58 ± 0.03 <sup>f</sup>
5	2	6.2	28	9.15 ± 0.04 <sup>o</sup>
6	4	6.2	28	14.18 ± 0.07 <sup>g</sup>
7	2	6.2	32	15.68 ± 0.1 <sup>e</sup>
8	4	6.2	32	12.98 ± 0.03 <sup>j</sup>
9	3	5.6	28	12.48 ± 0.02 <sup>l</sup>
10	3	6.8	28	10.35 ± 0.05 <sup>n</sup>
11	3	5.6	32	14.88 ± 0.03 <sup>c</sup>
12	3	6.8	32	13.95 ± 0.05 <sup>h</sup>
13	3	6.2	30	17.55 ± 0.02 <sup>a</sup>
14	3	6.2	30	17.42 ± 0.07 <sup>b</sup>
15	3	6.2	30	17.42 ± 0.02 <sup>b</sup>
16	3	6.2	30	17.15 ± 0.04 <sup>c</sup>
17	3	6.2	30	16.48 ± 0.08 <sup>d</sup>

#### 2.4.2 各因素的交互作用

根据回归方程, 通过响应面曲面图及等高线图的形状, 分析接种量、硝酸钠和时间对抑菌圈直径的影响。通过观察响应曲面图的坡度陡峭程度, 确定对响应值的两个因素影响程度, 响应面曲面图越陡峭, 两因素的交互作用越明显<sup>[32]</sup>。接种量 (A)、硝酸钠 (B)、时间 (C) 对抑菌圈直径的影响见图 9~11。

表 8 抑菌圈直径模型及回归系数的回归分析  
Table 8 Regression analysis of the inhibition circle diameter model and regression coefficient

来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	105.56	9	11.73	50.66	< 0.000 1	**
A- 接种量	3.92	1	3.92	16.93	0.004 5	**
B- 硝酸钠	1.74	1	1.74	7.51	0.028 9	*
C- 时间	16.05	1	16.05	69.31	< 0.000 1	**
AB	4.26	1	4.26	18.42	0.003 6	**
AC	14.94	1	14.94	64.52	< 0.000 1	**
BC	0.36	1	0.36	1.55	0.252 5	
A <sup>2</sup>	18.78	1	18.78	81.12	< 0.000 1	**
B <sup>2</sup>	20.28	1	20.28	87.58	< 0.000 1	**
C <sup>2</sup>	18.47	1	18.47	79.78	< 0.000 1	**
残差	1.62	7	2.30			
失拟项	0.88	3	0.29	1.59	0.325 2	ns
纯误差	0.74	4	1.90			
总和	107.18	16				

$R^2=0.984 9$   $R^2_{adj}=0.965 4$   $R^2_{pre}=0.857 8$

注:  $P < 0.01$  为极显著, 用 \*\* 表示,  $P < 0.05$  为显著, 用 \* 表示,  $P > 0.05$  为不显著, 用 ns 表示。

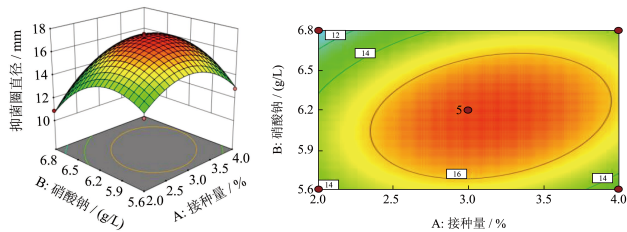


图 9 AB 交互作用对抑菌圈直径的影响

Fig.9 Effects of AB interaction on inhibition circle diameter

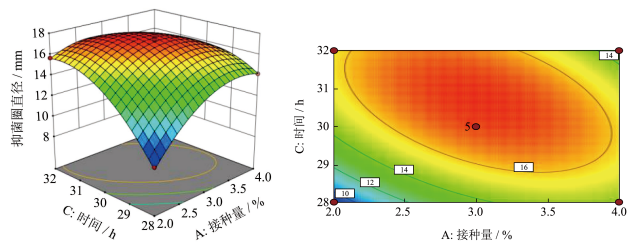


图 10 AC 交互作用对抑菌圈直径的影响

Fig.10 Effects of AC interaction on inhibition circle diameter

接种量和硝酸钠的交互作用对抑菌圈直径的影响如图 9 所示, 当硝酸钠添加量较低时, 抑菌圈直径随接种量的增加呈先增加后缓慢降低的趋势, 且当时间取值不同时, 抑菌圈直径随硝酸钠的增加变化幅度有所差异, 由此说明接种量和硝酸钠之间存

在显著的交互效应, 仅考虑二者交互作用的条件下, 当接种量为 2.5%~3.5% 水平左右、硝酸钠在 5.9~6.5 g/L 水平范围内时, 抑菌圈直径达到最大值。

接种量和时间的交互作用对抑菌圈直径的影响如图 10 所示, AC 交互曲面中, 当时间较低时, 抑菌圈直径随接种量的增加呈先增加后平缓的趋势, 当接种量较低时, 抑菌圈直径随时间的增加呈先增加后平缓的趋势, 当接种量较高时, 抑菌圈直径随时间的增加呈先增加后降低的趋势, 由此说明接种量和时间存在显著的交互作用, 仅考虑二者交互作用的条件下, 当接种量为 2.5%~3.5%、时间为 29~31 h 水平范围内, 抑菌圈直径达到最大值。

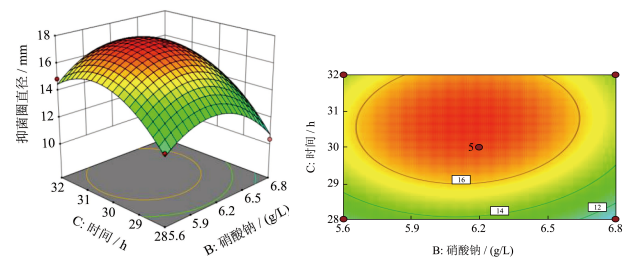


图 11 BC 交互作用对抑菌圈直径的影响

Fig.11 Effects of BC interaction on inhibition circle diameter

硝酸钠和时间的交互作用对抑菌圈直径的影响如图 11 所示, BC 交互曲面中, 抑菌圈直径的变化坡度随时间、硝酸钠的增加呈先增加后降低的趋势, 在 BC 的交互作用条件下, 在硝酸钠为 6.5~5.9 g/L、时间为 29~31 h 水平范围内, 其抑菌圈直径取得最大值。

## 2.5 响应面优化验证

表 9 优化验证结果

Table 9 Optimize validation results

	优化前/mm	优化后/mm
大肠杆菌	11.34 ± 0.16	17.63 ± 0.12
李斯特菌	12.13 ± 0.2	17.21 ± 0.08

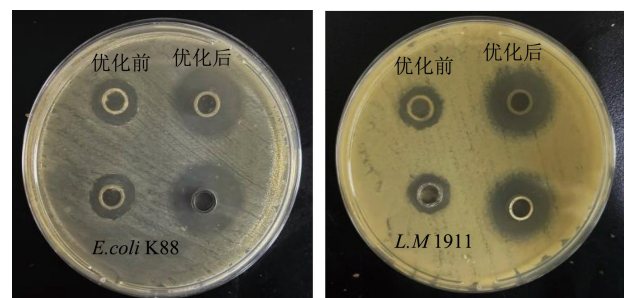


图 12 优化验证结果图

Fig.12 Optimization verification result



根据回归方程模型,以抑菌圈直径最大值为优化目标,得到预测的最优条件为:接种量为3.0%、硝酸钠为6.15 g/L、时间为30.7 h,在此最优条件下以优化前的Landy培养基和培养条件作为对照,比较优化后的发酵液的抑制活性,结果如表9和图12所示,得到其抑菌圈直径为17.63 mm和17.21 mm,较优化前提高了55%,比王芳等<sup>[31]</sup>实验优化结果高了42.4%,且与预测值的抑菌圈直径为17.459 mm基本吻合,证实了响应面模型的可靠性,活菌数从优化前的 $2.42 \times 10^8$  CFU/mL提升到了 $6.71 \times 10^8$  CFU/mL,说明在该优化条件下,也可有效提高贝莱斯芽孢杆菌的生物量。

### 3 结论

发酵物质是由细菌在新陈代谢过程中形成的,由于细菌中产生发酵物质的类型和产量受培养组分、环境条件的影响较大,因此可以对发酵培养基和发酵条件都加以优化,从而使发酵培养基中的抑菌产物定向地堆积。可以为抗菌物质的工业化生产奠定物质基础,同时也为研究贝莱斯芽孢杆菌对食源性腐败菌的抑制机理提供理论基础。本研究采用了贝莱斯芽孢杆菌作为发酵菌种,以抑菌圈直径为评价指标,通过单因素实验和P-B试验,筛选出3个对贝莱斯芽孢杆菌抑菌活性具有显著影响的因素,分别为硝酸钠、时间和接种量,利用最陡爬坡设计确定响应面的中心位点,进行Box-Behnken因子设计。得到改良培养基配方和最佳培养条件为乳糖添加量10 g/L,硝酸钠添加量6.15 g/L,接种量3%,转速220 r/min,温度34 °C,时间30.7 h。在该发酵条件下,实测抑菌圈直径值为17.6 mm,较优化前提高了55%,与预测值17.459 mm接近,且活菌数从优化前的 $2.42 \times 10^8$  CFU/mL提升到了 $6.71 \times 10^8$  CFU/mL,说明该模型对贝莱斯芽孢杆菌发酵生产具有指导意义。

### 参考文献

- [1] STOEV S D. Food safety and increasing hazard of mycotoxin occurrence in foods and feeds [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2013, 50(9): 887-901.
- [2] TAKWA S, ARBUTUS U L, OCIMUM B L. As sources of natural preservatives for food industry: A case study using loaf bread [J]. *LWT*, 2018, 88: 47-55.
- [3] LI F Z, ZENG Y J, ZONG M H, et al. Bioprospecting of a novel endophytic *Bacillus velezensis* FZ06 from leaves of *Camellia assamica*: Production of three groups of lipopeptides and the inhibition against food spoilage microorganisms [J]. *Journal of Biotechnology*, 2020, 323: 42-53.
- [4] AINO M. Studies on biological control of bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* using endophytic bacteria [J]. *Journal of General Plant Pathology*, 2016, 82(6): 323-325.
- [5] YAN F, LI C H, YE X L, et al. Antifungal activity of lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* MG3 against *Colletotrichum gloeosporioides* in loquat fruits [J]. *Biological Control*, 2020, 146: 104281.
- [6] JOVANA D, SEBASTIEN L, FRANCOIS C, et al. Mycosubtilin and surfactin are efficient, low ecotoxicity molecules for the biocontrol of lettuce downy mildew [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98: 6255-6264.
- [7] GUO Q G, DONG W X, LI S Z, et al. Fengycin produced by *Bacillus subtilis* NCD-2 plays a major role in biocontrol of cotton seedling damping-off disease [J]. *Microbiological Research*, 2014, 169(7): 533-540.
- [8] 邓丽,孙冉,姚蒋庞,等.贝莱斯芽孢杆菌粗提物对金黄色葡萄球菌的抑菌机制[J].食品与发酵科技,2021,57(3):1-9.
- [9] 朱亚珠,夏率博,陈琳,等.一株贝莱斯芽孢杆菌的生长特性及抑菌活性研究[J].食品科学技术学报,2022,40(1):85-92.
- [10] CHEN M C, WANG J P, ZHU Y J, et al. Antibacterial activity against *Ralstonia solanacearum* of the lipopeptides secreted from the *Bacillus amyloliquefaciens* strain FJAT-2349 [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2019, 126(5): 1519-1529.
- [11] ANIL K S, RIA R, SWARANJIT S C. Substrate dependent *in vitro* antifungal activity of *Bacillus* sp strain AR2 [J]. *Microbial Cell Factories*, 2014, 13: 1-11.
- [12] SHINJI M, MAKOTO S. Medium optimization of antifungal lipopeptide, iturin A, production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation by response surface methodology [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 76: 101-108.
- [13] 刘瑾,张朝正,赵华.抗尖孢镰刀菌贝莱斯芽孢杆菌P9培养基及发酵条件优化[J].中国酿造,2023,42(2):157-162.
- [14] 韩旭东,张玉苍,李瑞松,等.芽孢杆菌ZYCHH-01发酵条件优化及其抑菌物质的研究[J].中国酿造,2020,39(2):38-43.
- [15] 方呈祥.中国高等学校菌种目录[M].北京:化学工业出版社,2009.
- [16] 缪伏荣,陈鑫珠,邱华玲,等.一株贝莱斯芽孢杆菌的分离与鉴定[J].中国农学通报,2021,37(18):109-116.
- [17] LIU G Q, KONG Y Y, FAN Y J, et al. Whole-genome sequencing of *Bacillus velezensis* LS69, a strain with a broad inhibitory spectrum against pathogenic bacteria [J]. *Biotechnol*, 2017, 249(1): 20-24.

- [18] CALVO H, MENDIARA I, ARIAS E, et al. Antifungal activity of the volatile organic compounds produced by *Bacillus velezensis* strains against postharvest fungal pathogens [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2020, 166(1): 1-10.
- [19] 刘雪飞,郭端煦,吕淑霞,等.莫海威芽孢杆菌J7产抑菌物质培养基发酵优化[J].*中国食品学报*,2018,18(10):109-119.
- [20] THANOMSUB B, PUMEECHOCKCHAI W, LIMTRAKUL A, et al. Chemical structures and biological activities of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* B189 isolated from milk factory waste [J]. *Bioresource Technology*, 2006, 97(18): 2457-2461.
- [21] 朱祥杰,王震,苑志欣,等.海洋芽孢杆菌N11-8产蛋白酶的发酵条件优化[J].*渔业科学进展*,2018,39(6):155-163.
- [22] 李光月,李雪玲,祁姣姣,等.响应面法优化枯草芽孢杆菌表面活性素的发酵工艺[J].*食品工业科技*,2022,43(12): 146-154.
- [23] ELAZZAZY A M, ABDELMONEIM T S. Isolation and characterization of biosurfactant production under extreme environmental conditions by alkali-halo-thermophilic bacteria from Saudi Arabia [J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2015, 22(4): 466-475.
- [24] ABDEL-MAWGOUD A M, ABOULWafa M M, HASSOUNA N A H. Optimization of surfactin production by *Bacillus subtilis* isolate BS5[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2008, 150: 305-325.
- [25] 贡国鸿.生物表面活性剂surfactin的发酵调控、分离纯化及理化性质研究[D].合肥:中国科学院合肥物质科学研究院,2008.
- [26] OHNO A, TAKASHI A, MAKOTO S. Effect of temperature on production of lipopeptide antibiotics, iturin A and surfactin by a dual producer, *Bacillus subtilis* RB14, in solid-state fermentation [J]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1995, 80(5): 517-519.
- [27] 丰磊,魏伟群,付鸣佳,等.枯草芽孢杆菌SX3411产抑菌物质的发酵条件优化[J].*江西师范大学学报(自然科学版)*, 2021,45(5):503-513.
- [28] 舒梨.副干酪乳杆菌素的分离纯化、抑菌特性及机理初探[D].宜宾:四川轻化工大学,2019.
- [29] 兰成忠,甘林,代玉立,等.黄瓜枯萎病菌拮抗菌的筛选、鉴定和防效测定[J].*中国生物防治学报*,2023,39(1):184-193.
- [30] OLENIKOVA G K, DMITRENOK A S, VOINOV V G, et al. Bacillomycin D from the marine isolate of the bacterium *Bacillus subtilis* KMM 1922 [J]. *Chemistry of Natural Compounds*, 2005, 41(2): 240-242.
- [31] 姬杨,冯红.短小芽孢杆菌BA06产表面活性素培养基组分的优化[J].*四川大学学报:自然科学版*,2016,53(4):925-930.
- [32] 浦馨源.符离集烧鸡特征风味分析及现代化工艺研究[D].合肥:合肥工业大学,2021.
- [33] 王芳,曹璐,秦菁菁,等.大麻白绢病生防菌贝莱斯芽孢杆菌的筛选鉴定及发酵条件优化[J].*中国麻业科学*,2023, 45(2):66-75.